



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/09, C12Q 1/02, G01N 33/566, C12N 5/10, A61K 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/00491 (43) 国際公開日 1999年1月7日(07.01.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02785 (22) 国際出願日 1998年6月23日(23.06.98) (30) 優先権データ 特願平9/171440 1997年6月27日(27.06.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 萩谷 洋(HAGIYA, Hiroshi)[JP/JP] 南 真志(MINAMI, Masashi)[JP/JP] 田嶋久男(TAJIMA, Hisao)[JP/JP] 〒618-8585 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihisa et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL PLASMID DNA CONTAINING REPORTER GENE DNA AND USE OF THE SAME (54)発明の名称 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNAおよびその用途 (57) Abstract A novel plasmid DNA containing a reporter gene DNA; a transformant prepared by using the above plasmid DNA and a known DNA encoding effector proteins; remedies for cancer or autoimmune diseases containing both the DNAs as the active ingredients; and a method for detecting a ligand of an intranuclear receptor by using the above transformant.		

(57)要約

新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体、前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤、および前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴィエトナム
CI	コートジボアール	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KR	韓国	SD	スーダン		
EE	エストニア	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
		LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNAおよびその用途

5

技術分野

本発明は、(i) 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、
(ii) 前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで
形質転換された形質転換体、(iii) 前記両DNAを有効成分として含有するガ
ンまたは自己免疫疾患の治療剤、および(iv) 前記形質転換体を用いる細胞核
10 内受容体のリガンドの検出方法に関する。

さらに詳しくは、(i) 新規なレポーター遺伝子、すなわち酵母の基本転写
因子であるG a l 4蛋白の応答配列（以下、U A Sと略記する。）を複数回繰
り返したエンハンサーエレメント下流に、必要最小限のプロモーター、さらに
遺伝子発現効果を検出するためにF a s抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含
15 むアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドDNA、(ii) 前記プ
ラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白、すなわちG a l 4蛋白のDNA結合
領域を含むアミノ酸配列のC端末に、細胞核内受容体のリガンド結合領域を含
むアミノ酸配列を結合させた融合蛋白をコードするDNAの2つで形質転換さ
れた形質転換体、(iii) 前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自
20 己免疫疾患の治療剤、および(iv) 前記形質転換体を用いる細胞核内受容体の
リガンドの検出方法に関する。

背景技術

最近、サイトカインやホルモンに代表される、重要な生理活性を有する液性
25 因子の受容体が遺伝子操作によって解明され、多くの受容体が単離、同定され
てきた。それらの中には、例えば、細胞核内受容体と総称される脂溶性ホルモ
ンの受容体がある。種々の細胞核内受容体のアミノ酸配列を解析した結果、そ

れらは共通の基本構造を有するリガンド依存性の転写因子であり、ひとつの遺伝子ファミリーを形成することが明らかとなった。すなわち、グルココルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、ミネラルコルチコイド受容体、アンドロジェン受容体、エストロジェン受容体などのステロイド受容体、レチノイドX受容体、レチノイン酸受容体等のレチノイド受容体、さらにペルオキシソーム増殖薬活性化受容体、ビタミンD₃受容体や甲状腺ホルモン受容体からなるファミリーである。これらの受容体については、リガンド結合部位、標的DNAの配列を認識する部位などの機能領域が明確に分離していることがわかっており [Science, 240, 889(1988)参照]、その相同性から単離はされたが、リガンドが依然として不明である受容体も存在する。

最近、脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現誘導にかかわる転写因子の研究において、核内受容体であるペルオキシソーム増殖薬活性化受容体（以下、PPAR受容体と略記する。）が注目されている。PPAR受容体は、さまざまな動物種からcDNAがクローニングされ、複数のアイソフォーム遺伝子が見出され、哺乳類では α 、 δ 、 γ の3種類が知られている。さらに、 γ 型は脂肪組織、免疫細胞、副腎、脾臓、小腸で、 α 型は肝臓、網膜で発現し、 δ 型は組織特異性が見られず普遍的に発現していることも知られている。

一方、Fas抗原は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）に関与することが明確に示された膜蛋白である。ヨネハラ（Yonehara）等は、ヒト細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、種々のヒト細胞に対し致死活性を示す抗Fas抗体を得た [J. Exp. Med., 169, 1747(1989)参照]。抗Fas抗体の認識する細胞表面分子のcDNAが単離され、ヒトFas抗原の構造が決定された [Cell, 66, 233(1991)参照]。このFas抗原は335個のアミノ酸からなり、N末端側16個のアミノ酸はシグナルペプチドと推定されている。分子の中央には疎水性アミノ酸17個よりなる膜貫通領域が存在し、N末端側157個のアミノ酸が細胞外領域、C末端側145個のアミノ酸が細胞質領域と考えられる。

F a s 抗原の構造は、ガン壊死因子 (T N F) の受容体と類似しているため、F a s 抗体によるアポトーシスはT N F の作用と類似したメカニズムで起こるものと推定されている。F a s 抗原の機能領域も次第に明らかにされ、アポトーシスのシグナル伝達に必須の領域 (機能発現領域) は175番目から304番目までのアミノ酸配列部分であることがわかっている [J. Biol. Chem., 268, 10932 (1993) 参照]。さらに、マウスのF a s 抗原についても、そのアミノ酸配列が明らかになっており [J. Immunology, 148, 1274 (1992) 参照]、ヒトのF a s 抗原に対して全体として 49.3% のホモロジーを有している。また機能発現領域は、ヒトF a s 抗原の該領域に相当する、166番目から291番目までのアミノ酸配列であると考えられている。

受容体はリガンド結合領域とシグナル伝達領域を有している。リガンド結合領域にリガンドが結合すると、シグナル伝達領域の立体構造が変化し、シグナルが別の蛋白やDNAに伝達される。

最近、ある受容体のリガンド結合領域と、異種の蛋白質のシグナル伝達領域とを結合した融合蛋白におけるシグナル伝達に関する研究が盛んに行なわれている。

例えば、ステロイド受容体のひとつであるエストロジェン受容体のリガンド (すなわち、エストロジェン) 結合領域とヒトガン遺伝子c - M y c のシグナル伝達領域との融合蛋白をコードする遺伝子で形質転換された細胞は、エストロジェンの刺激によって細胞がガン化し、異常増殖することが判明した [Nature, 340, 66 (1989) 参照]。

同様の実験が、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロジェンの各受容体のリガンド結合領域とE 1 A (アデノウイルス)、c - F o s、v - M y b、C / E B P、v - R e l、G A T A - 1, 2, 3、G A L 4 - V P 1 6、R e v (H I V)、c - A b 1 の各蛋白質の機能発現領域との融合蛋白において行なわれており [Cell, 54, 1073 (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5114 (1991)、EMBO J., 10, 3713 (1991)、Science, 251, 288 (1991)、

EMBO J., 11, 4641 (1992)、Genes Dev. (in press)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1657 (1993)、ibid., 87, 7787 (1990)、EMBO J., 12, 2809 (1993) 参照]、いずれも核内受容体に対応するリガンドが結合されることによってシグナルが伝達されることが確認されている。

- 5 垣塚らは、前記した融合蛋白をガン治療に応用する目的でシグナル伝達蛋白として Fas 抗原を用いる方法を報告している (特開平 7-316200 号参照)。この方法は、機能発現領域だけでなく膜貫通領域も含めた 136 番目から 305 番目までのアミノ酸配列部分を、細胞核内受容体のリガンド結合領域と融合させるものである。その結果、核内受容体リガンド結合領域のアミノ酸配列に相互作用するリガンドが有効に検出できる。

- 一方、エヴァンス (R. M. Evans) らは Gal 4 応答配列下流に基質を化学発光または可視色素の産物に変換するか、または置換基を導入する酵素 (例えば、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、分泌型アルカリホスファターゼまたはクロラムフェニコールアセチル転移酵素等) を用いたレポーターと、
- 15 Gal 4 の DNA 結合ドメインと PPAR 受容体リガンド結合領域とを融合した蛋白を細胞内に導入するレポーターアッセイの方法を報告している (PCT 国際出願国際公開 9640128 号参照)。また、外来性の PPAR 受容体蛋白を発現させ、または内在性の PPAR 受容体蛋白と、上記のレポーター、ただしこの場合は PPAR 受容体応答配列 (以下、PPRE と略記する。) 下流に上記
- 20 の酵素を用いたレポーターを導入するアッセイの方法が報告されている (Cell, 83, 803 (1995) 参照)。これらのアッセイ系は、細胞核内受容体の転写因子としての機能を評価できる検出系である。

- しかし、これらの方法は、活性検出に時間を要し、リガンドや被験化合物の効果を高速スクリーニングすることが困難である。かつ、細胞内に DNA を導入する際に一過性導入であるため実験間の安定性に難があり、比較しにくいという問題がある。
- 25

発明の開示

本発明者らは、細胞核内受容体のリガンドに結合する化合物を高速スクリーニングする目的で検討を重ねた結果、F a s 蛋白を発現させるレポーターアッセイを用いることにより、目的を達成することを見出した。

- 5 すなわち、F a s 構造蛋白の機能領域を用いたレポーターとG a l 4のDNA結合領域と核内受容体（特に、P P A R受容体）リガンド結合領域とを融合した蛋白をコードするDNAを含む発現ベクターをマウス繊維芽細胞L 9 2 9細胞内に安定導入した。核内受容体のリガンド結合領域のアミノ酸配列にリガンドや化合物が結合しない状態では細胞が増殖するが、リガンドや化合物が結合した場合はF a s 蛋白が発現誘導され、細胞死が生じた。この細胞死を起こした細胞を生存細胞と洗浄分離した後、生存細胞を色素染色し、その吸光度を測定することにより、細胞核内受容体のリガンド結合領域と相互作用し、かつ機能的に転写因子活性を上昇、あるいは減少させる化合物を高速でスクリーニングすることに成功した。

- 15 本発明の高速スクリーニング方法は、これまでまったく知られていない新規な方法である。

- 本発明の方法は、レポーターとしてF a s 構造蛋白機能領域を用い、F a s 蛋白を発現させ細胞死を起こさせて測定するものであって、レポーターとして化学発光（特に、ルシフェラーゼ）または可視色素を生む酵素（特に、 β -ガラクトシダーゼ）を用い、酵素の発現量（酵素活性）を測定するエヴァンス（R. M. Evans）らの方法とは全く異なるものである。

- 標準的な実験方法における比較においては、エヴァンス（R. M. Evans）らの方法では第1日目に細胞にDNAを導入し、血清刺激を行なった後、必要に応じて再播種し、46～48時間後（第3日目）に被験化合物を加え、その24時間後（最終日）にルシフェラーゼ活性を測定する最短4日のスケジュールである。また、細胞内にDNAを導入する際の一過性導入では実験間の安定性や比較が問題になる。各測定を標準化するために別の酵素をコードするDNA

を含む発現ベクターを共導入する場合もあるが操作は繁雑になる。さらに、ルシフェラーゼを用いる方法は個々の値の振れが大きいため数多い例数が必要である（通常n数を3～4要す。）。あるいは、上述したように同時に導入した内標遺伝子（ β -ガラクトシターゼ等）で標準化する必要がある。

- 5 一方、本発明では細胞が準備されていれば、第1日目に被験化合物を加え、翌日の後半（36時間後）には細胞を色素染色によって測定できる最短2日のスケジュールである。また、L929細胞（同一クローン）を使用するため実験間の比較が容易である。さらに、安定導入細胞を用いる本方法は個々の値の振れが小さいため数多い例数が必要とならない（通常n数が1～2で十分判別
10 できる。）。

- すなわち、本発明の方法によれば、細胞核内受容体の機能を変化させうるリガンドや化合物の高速評価が可能であり、操作自体が簡便である。また、個々の値の振れが小さく、実験間の比較ができ、非常に安定している。以上のことは、特に多検体高速評価において威力を発揮する。さらに実際汎用されている
15 自動測定器（ロボット）では標準仕様として吸光度測定器が付属されているので、ロボット対応型の化合物評価系といえる。このことは先行技術からみて全く予期できないことであり、今回本発明者らが実験により初めて確認したことである。また、本発明の方法では酵素基質を全く必要としないため、大幅なコストダウンが図られる。

20

図面の簡単な説明

- 第1図は、PPAR γ リガンド応答性のL929細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示す図である。図中（A）はPPAR γ リガンド応答細胞の場合を示し、（B）は正常細胞の場合を示す。
25

第2図は、PPAR γ リガンド応答性のL929細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示す図である。図

中 (A) は P P A R γ リガンド応答細胞の場合を示し、(B) は正常細胞の場合を示す。

第3図は、P P A R α リガンド応答性の L 9 2 9 細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示す図である。図中 (A) は P P A R α リガンド応答細胞の場合を示し、(B) は正常細胞の場合を示す。

第4図は、P P A R δ リガンド応答性の L 9 2 9 細胞を用いた殺細胞アッセイを行ない各化合物を処理後の生細胞数の用量依存的な変化を示す図である。図中 (A) は P P A R δ リガンド応答細胞の場合を示し、(B) は正常細胞の場合を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、

(i) 新規なレポーター遺伝子DNAを含むプラスミドDNA、

(ii) 前記プラスミドDNAと公知のエフェクター蛋白をコードするDNAで形質転換された形質転換体、

(iii) 前記両DNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患の治療剤、および

(iv) 前記形質転換体を用いる細胞核内受容体のリガンドの検出方法に関する。

本発明においては、F a s 抗原および細胞核内受容体は、哺乳動物由来のもの、例えば、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット由来のものが用いられる。F a s 抗原および細胞核内受容体は、好ましくは互いに同じ種のもので用いられるが、異なった種のもので用いてもよい。本発明では互いに異なった種のもので用いてもシグナル伝達が行えることが確認されている。

例えば、ヒトのF a s 抗原とヒトの細胞核内受容体の組合せ、マウスのF a s 抗原とヒトの細胞核内受容体の組合せ、ヒトのF a s 抗原とラットの細胞核内受容体の組合せ、マウスのF a s 抗原とラットの細胞核内受容体の組合せ、ヒ

トのF a s 抗原とマウスの細胞核内受容体の組合せ、またはマウスのF a s 抗原とマウスの細胞核内受容体の組合せが好適に用いられる。

本発明に用いられるF a s 抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列、および細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列としては、
5 各領域に相当する部分だけを用いてもよいが、それ以外に、各領域に相当する部分の両端（N末端および／またはC末端）に、フランキング領域（機能領域に
関与しない領域、アミノ酸配列にして数10個、好ましくは60個以下）を含んだものを用いてもよい。さらに、所望の場合には、F a s 抗原の膜貫通領域のN末端には、シグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列を結合していても
10 よい。各領域に相当するアミノ酸配列としては、天然のアミノ酸配列だけでなく、本来のF a s 抗原が有するアポトーシス機能または細胞核内受容体が有するリガンド結合機能を損なわない程度に、アミノ酸が欠損、置換、付加および
／または挿入されたものを用いることができる。

本発明で用いられるF a s 抗原のうち、ヒトF a s 抗原の膜貫通領域と機能
15 発現領域を含むアミノ酸配列としては、145番目のS e rから319番目のV a lがあり、マウスF a s 抗原では136番目のS e rから305番目のL e uまでの配列が好適に用いられる。また、シグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列としては、ヒトF a s 抗原では-16番目から23番目までの配列、
そしてマウスF a s 抗原では-21番目から14番目までの配列が好適に用い
20 られる。

本発明で用いられるエフェクター蛋白中の細胞核内受容体としては、グルコ
コルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、ミネラルコルチコイド受容体、
アンドロジェン受容体、エストロジェン受容体等のステロイド受容体、レチノ
イドX受容体、レチノイン酸受容体等のレチノイド受容体、ペルオキシソーム
25 増殖薬活性化受容体、ビタミンD₃受容体、または甲状腺ホルモン受容体が挙げられる。好適には、ヒトまたはラットのエストロジェン受容体、ヒトまたはマウスのレチノイドX受容体 α 、レチノイドX受容体 β またはレチノイドX受

容体 γ あるいはヒトまたはマウスのレチノイン酸受容体 α 、レチノイン酸受容体 β またはレチノイン酸受容体 γ 、ヒトまたはマウスのPPAR α 受容体、ヒトまたはマウスのPPAR δ 受容体、ヒトまたはマウスのPPAR γ 受容体が用いられる。

- 5 それぞれ受容体のリガンド結合領域は既に知られており [Science, 240, 889(1988)、Mol. Endocrinology, 6, 1634(1992)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)、J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157(1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7355(1994)参照]、例えば、ヒトグルココルチコイド受容体では528番目から777番目まで、ヒトプロゲステロン受
10 容体では680番目から934番目まで、ヒトミネラルコルチコイド受容体では734番目から984番目まで、ヒトアンドロジェン受容体では676番目から919番目まで、ヒトエストロジェン受容体では311番目から551番目まで、ラットエストロジェン受容体では307番目から557番目まで、ヒトレチノイドX受容体 α では225番目から462番目まで、ヒトレチノイド
15 X受容体 β では297番目から526番目まで、マウスレチノイドX受容体 α では230番目から467番目まで、マウスレチノイドX受容体 β では171番目から410番目まで、マウスレチノイドX受容体 γ では229番目から463番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 α では198番目から462番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 β では191番目から448番目まで、ヒトレチノイ
20 ン酸受容体 γ では200番目から454番目まで、マウスレチノイン酸受容体 α では198番目から462番目まで、マウスレチノイン酸受容体 β では190番目から448番目まで、マウスレチノイン酸受容体 γ では200番目から458番目まで、ヒトビタミンD₃受容体では192番目から427番目まで、ヒト甲状腺ホルモン受容体 α では183番目から410番目まで、ヒト甲状腺
25 ホルモン受容体 β では232番目から456番目まで、ヒトPPAR γ (ヒトPPAR γ 1サブタイプ) 受容体の280番目から478番目まで、マウスPPAR γ (マウスPPAR γ 1サブタイプ) 受容体の278番目から475番

目まで、ヒトPPAR α 受容体の273番目から468番目まで、マウスPPAR α 受容体の273番目から468番目まで、ラットPPAR α 受容体の273番目から468番目まで、ヒトPPAR δ 受容体の246番目から441番目まで、またはマウスPPAR δ 受容体の245番目から440番目までの
5 アミノ酸である。

好適には、ヒトエストロジェン受容体の311番目から551番目まで、ラットエストロジェン受容体の307番目から557番目まで、ヒトレチノイドX受容体 α の225番目から462番目まで、ヒトレチノイドX受容体 β の297番目から526番目まで、マウスレチノイドX受容体 α の230番目から4
10 67番目まで、マウスレチノイドX受容体 β の171番目から410番目まで、マウスレチノイドX受容体 γ の229番目から463番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 α の198番目から462番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 β の191番目から448番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 γ の200番目から454番目まで、マウスレチノイン酸受容体 α の198番目から462番目ま
15 で、マウスレチノイン酸受容体 β の190番目から448番目まで、マウスレチノイン酸受容体 γ の200番目から458番目まで、ヒトPPAR γ （ヒトPPAR γ 1サブタイプ）受容体の176番目から478番目まで、マウスPPAR γ （マウスPPAR γ 1サブタイプ）受容体の174番目から475番目まで、ヒトPPAR α 受容体の167番目から468番目まで、マウスPPAR α 受容体の167番目から468番目まで、ラットPPAR α 受容体の2
20 167番目から468番目まで、ヒトPPAR δ 受容体の139番目から441番目まで、またはマウスPPAR δ 受容体の138番目から440番目までの配列が用いられる。

より好適には、ヒトエストロジェン受容体の281番目から595番目まで、
25 ラットエストロジェン受容体の286番目から600番目まで、ヒトレチノイン酸受容体 α の176番目から462番目まで、マウスレチノイン酸受容体 α の177番目から458番目まで、ヒトPPAR γ （ヒトPPAR γ 1サブタ

イブ) 受容体の166番目から478番目まで(ヒトPPAR γ 2サブタイプでは194番目から506番目に相当する)、マウスPPAR γ (マウスPPAR γ 1サブタイプ) 受容体の164番目から475番目まで(マウスPPAR γ 2サブタイプでは194番目から505番目に相当する)、ヒトPPAR α 受容体の157番目から468番目まで、マウスPPAR α 受容体の157番目から468番目まで、ラットPPAR α 受容体の157番目から468番目まで、ヒトPPAR δ 受容体の129番目から441番目まで、またはマウスPPAR δ 受容体の128番目から440番目までの配列が用いられる。

本発明において用いられる、より好ましいエフェクター蛋白としては、

10 (i) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR γ 1受容体の176番目のセリン(Ser)から478番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

(ii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR γ 1受容体の174番目のセリン(Ser)
15 から475番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

(iii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR γ 2受容体の204番目のセリン(Ser)
20 から506番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

(iv) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR γ 2受容体の204番目のセリン(Ser)から505番目のチロシン(Tyr)までのアミノ酸配列を結合させたエフェ
25 クター蛋白、

(v) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR α 受容体の167番目のセリン(Ser)から

468番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

(vi) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR α 受容体の167番目のセリン (Ser) から468番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、

(vii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、ヒトPPAR δ 受容体の139番目のセリン (Ser) から441番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白、および

(vii) Gal4蛋白のDNA結合領域の1番目から147番目までのアミノ酸配列のC末端に、マウスPPAR δ 受容体の138番目のセリン (Ser) から440番目のチロシン (Tyr) までのアミノ酸配列を結合させたエフェクター蛋白が挙げられる。

15 本発明のレポータープラスミド内に繰り返し構造として含まれるGal4蛋白の応答配列であるUASとしては既に知られているものを用いた (Cell, 83, 803(1995)および Cell, 83, 813(1995)参照)。すなわち、5' -CGACGGAGTACTGTCC TCCG-3' の配列を数回、具体的には3回以上、好ましくは4回、より好ましくは5回繰り返した配列である。

20 本発明のプロモーターとしてはSV40、HSV、LTR、メタロチオネインプロモーター、チミジンキナーゼ (TK) プロモーターである。好ましくは、TKプロモーターである。より具体的には、プラスミドpTK β (クロンテック社、Cat. No. 6179-1) に用いられているように (pTK β のマップで165番目から945番目までに相当)、転写開始点を1としてTKプロモーターのmRNAの-727番目から56番目までが好ましい。より好ましくはTK
25 プロモーターのmRNAの-105番目から51番目までである。

本発明には、本発明のレポータープラスミドをコードするDNAも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1～6種類（例えば、メチオニン（Me t）は1種類、ロイシン（Le u）は6種類）知られている。従って、アミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることができる。

- 5 本発明には、本発明のレポータープラスミドをコードするDNAのうち F a s 蛋白ポリペプチドとして同一となるDNA配列全ての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、融合蛋白の生産性が向上することがある。

10 本発明のレポータープラスミドをコードするDNAは、以下の方法に従って作製することができる。

すなわち、

- （i） F a s 抗原と細胞核内受容体のアミノ酸配列のうち、必要とする領域を含むアミノ酸配列をコードするDNAをポリメラーゼチェーンリアクション（P C R）法により増幅し、
- 15 （ii） 適当なベクターに、 F a s 抗原より得られたP C R生成物を組み込み、続いて、細胞核内受容体より得られたP C R生成物を組み込むことにより行なわれる。

より詳細に説明すると、

- 工程（i）は融合に必要な部品をP C R法により増幅する工程である。
- 20 F a s 抗原の場合は、膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列を化学合成し、プライマーとして用いる。また、細胞核内受容体の場合は、リガンド結合領域を含むアミノ酸配列をコードする塩基配列を化学合成し、プライマーとして用いる。

- 得られたプライマーの5'末端には特定の制限酵素サイトを設けておく。また
- 25 P C R法のテンプレートとしては、相当する哺乳動物、例えば、ヒト、マウス等の細胞または細胞株より単離、精製したmRNAを使用することができる。P C R法は、公知の方法により行なわれる。最近ではP C R自動化装置も普及

しているので、該装置が好適に用いられる。

工程(ii)は、発現ベクター中でG a l 4のDNA結合領域と核内受容体リ
ガンド結合領域に相当するDNAを融合する工程である。本工程に用いられる
プラスミドベクターとしては大腸菌内で機能するもの(例えば、p B R 3 2 2)
5 や枯草菌内で機能するもの(例えば、p U B 1 1 0)が多数知られているが、
いずれであっても好適に用いられる。また、直接発現ベクターに組み込むこと
も可能である。

哺乳動物細胞で発現させる場合、適当なベクター(例えば、レトロウイルス
ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、S V
10 4 0系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、S V 4 0プロモーター、
L T Rプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に、G a l 4
のDNA結合領域、次いで細胞核内受容体の当該P C R産物を挿入して発現ベ
クターを作製する。好適には、p C M X (Cell, 66, 663(1991)に記載されて
いる。)やp S V (Anal. Biochem., 188, 245(1990)に記載されている。)が用
15 いられる。

引き続き、工程(iii)はレポータープラスミドを製造する工程である。本工
程に用いられるプラスミドベクターは前述したように大腸菌内で機能するもの
や枯草菌内で機能するもの、いずれであってもよい。また、直接発現ベクター
に組み込むことも可能である。5'上流からG a l 4応答配列の繰り返し構造、
20 単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーター、F a s 構造蛋白をコー
ドするDNAの順にタンデムに配座したDNAを含むプラスミドはその由来が
大腸菌で機能するベクターであるか、哺乳動物細胞で機能するベクターである
かによって目的がかなえられる。前述したように、例えばo r i領域とプロモ
ーター制御因子、そしてひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子を含んで
25 いてもよい。哺乳動物細胞を用いる場合には、前記の哺乳動物細胞内で機能す
るプラスミドを用いて適当な哺乳動物細胞を形質転換し、これを適当な培地で
培養することによって、これらの細胞がF a s 蛋白発現依存性に死滅する検定

細胞となる。

哺乳動物細胞で発現させる場合には、所望により F a s 抗原のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の P C R 産物をプロモーターのすぐ下流に挿入することができる。

5 本発明の DNA からなる複製または発現ベクターとしては、例えば、o r i 領域と、必要により上記 DNA の発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなるプラスミド、ウイルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、プラスチサイジン S 耐性遺伝子）を含んでいてもよい。

10 また、本発明の蛋白発現系としては、前記の哺乳動物細胞内で機能する発現ベクターで適当な哺乳動物細胞（例えば、サル C O S - 7 細胞、チャイニーズハムスター C H O 細胞、マウス L 細胞、マウス繊維芽細胞、ヒトガン細胞等）を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とする融合蛋白を生産することができる。以上のようにして得られたポリペプチドは、
15 一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

本発明には、本発明の DNA からなる複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞が含まれる。

産業上の利用可能性

20 このようにして得られた本発明のプラスミド DNA は、ガンまたは自己免疫疾患治療剤として用いることができる。すなわち、本発明のプラスミド DNA を含む発現ベクターをガン病巣部または自己免疫疾患病巣部にターゲティング法（例えば、リボソーム内に封じ込めて）により局所的に投与する。このベクターは病巣部のガン細胞内に侵入し、遺伝子に入り込む。しかる後に、本発明
25 のエフェクター蛋白の一部を構成する細胞核内受容体に対応するリガンド（例えば、該受容体としてレチノイド X 受容体を用いた場合には 9 - c i s - レチノイン酸、レチノイン酸受容体を用いた場合にはビタミン A）を投与し、エフェ

クターを活性化させることによって、F a s 蛋白が発現するようになる。ガン細胞内で生産されたF a s 蛋白によってアポトーシスのシグナルが伝達され、かくしてガン細胞は死滅する。

さらに、本発明のプラスミドDNAは、細胞核内受容体に対するアゴニスト
5 またはアンタゴニストのスクリーニング法として広範に利用することができる。
すなわち、本発明に用いられるエフェクター蛋白（G a l 4 のDNA結合領域
下流に種々の核内受容体のリガンド結合領域をコードするDNAを含む発現ベ
クターDNA）をコードするDNAおよびレポーターDNAを含む発現ベク
ターを導入している細胞に、検体を添加する。もし細胞が死ねば、検体はアゴ
10 ニスト活性を有していることを示し、またアゴニスト存在下に細胞が生存すれ
ば、検体はアンタゴニスト活性を有していることが判明する。

本発明のスクリーニング方法では細胞核内受容体の機能を変化させうるリガ
ンドや化合物の高速評価が可能であり、効果（結果）が細胞死となって表われ
るので、その判定が容易であり、操作自体も簡便である。さらに、エフェクター
15 蛋白としてG a l 4 のDNA結合領域下流に種々の核内受容体のリガンド結合
領域をコードするDNAを配置することによって、リガンド未知のオーファン
受容体を含む核内受容体に作用する化合物の検索ができる一般性のある方法で
ある。もちろん、オーファン核内受容体の生理的リガンドの探索も可能である。
具体的には予想されうる生理的リガンド候補や血清の部分分画標品を上記細胞
20 に添加し、細胞死の有無によってリガンドの同定やリガンド活性を担う分画の
精製に利用できる。

また、本発明の方法は個々の値の振れが小さく、実験間の比較ができ、非常
に安定している。以上のことは、特に多検体高速評価において威力を発揮する。
さらに実際汎用されている自動測定器（ロボット）では標準仕様として吸光度
25 測定器が付属されているので、ロボット対応型の化合物評価系といえる。さら
に、この本発明のスクリーニング方法は酵素基質を全く必要としないため、大
幅なコストダウンが図れる。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例によって、より詳細かつ具体的に説明するが、もちろんこれによって本発明が制限されるものではない。

5

実施例1：マウスF a s 抗原のP C R 生成物の調製

フクナガ (Fukunaga) らの報告 (J. Immunology, 148, 1274(1992)参照) または垣塚 (Kakizuka) らの公開特許 (特開平 7-316200 号参照) に従い、マウスF a s 抗原の構造により以下のプライマーを調製した。

10 F 1 : 1 3 1 番目から 1 4 3 番目までのアミノ酸配列 : P r o C y s T h r A l a T h r S e r A s n T h r A s n C y s A r g L y s G l n の構造に相当し、5' 側の一部に制限酵素H i n d I I I サイトを導入したセンスプライマー : 5' - C C A A G C T T G G C G A C C A G C A A T A C A A A C T G C A G G A A A C - 3' (配列番号1) を合成した。

15 R 1 : 2 9 8 番目から 3 0 6 番目 (C 末端) までのアミノ酸配列 : A s n G l u A s n G l n G l y G l n C y s L e u G l u および 3' 非翻訳領域の一部に相当し、さらに 3' 側の一部にB a m H I サイトを導入したアンチセンスプライマー : 5' - T C A G G A T C C A G A C A T T G T C C T T C A T T T T C A T T - 3' (配列番号2) を合成した。

20 マウスT細胞株、R L M - 1 1 (Cell, 68, 1109(1992)に記載) より得られたmRNAを鋳型として用い、F 1 とR 1 をP C R プライマーとして用いて、サーマルシークエンサー (Perkin Elmer 社 GeneAmp PCR System 9600) を使用して、9 5 ° C で 1 8 0 秒 × 1 → (9 5 ° C で 6 0 秒、5 5 ° C で 6 0 秒、7 2 ° C で 6 0 秒) × 1 5 → 7 2 ° C で 1 8 0 秒の条件でR T - P C R を行なった。結果、
25 約 5 2 0 b p の断片 (以下、M F a s と記す。) を得、p Bluescript (商品名、プロメガ社) マルチクローニングサイトH i n d I I I、B a m H I 制限酵素部位に組み込んだ (以下、p B S M F a s と略記する。)

実施例2：ヒトPPAR α 、 γ または δ 受容体のPCR生成物の調製

マクハジェ (R. Mukherjee) ら (J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157(1994)参照)、グリーン (M. E. Greene) ら (Gene Expression, 4, 281(1995)参照) またはエルブレヒト (A. Elbrecht) ら (Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)参照) またはシュミット (Mol. Endocrinol., 6, 1134(1992)参照) に記載されたヒトPPAR α 、 γ または δ の受容体の構造より以下のプライマーを調製した。

F2：ヒトPPAR α の5' 非翻訳領域とN末端アミノ酸Met¹-Val²に相当するセンスプライマー：5'-AAC CAG CAC CAT CTG GTC GCG ATGGT-3' (配列番号3) を合成した。

R2：ヒトPPAR α の3' 非翻訳領域とアミノ酸停止コドンを含むアンチセンスプライマー：5'-AGG TGT GG CTG AT CTG AAG GAA CTCA-3' (配列番号4) を合成した。

F3：ヒトPPAR γ (γ 1サブタイプ) の5' 非翻訳領域とN末端アミノ酸Met¹-Met⁸に相当するセンスプライマー：5'-AGAAATGAC CATGGTTGACACAGAGA-3' (配列番号5) を合成した。

R3：ヒトPPAR γ (γ 1サブタイプ) の3' 非翻訳領域に相当するアンチセンスプライマー：5'-AAATGTTGGCAGTGGCTCAGGACTCT-3' (配列番号6) を合成した。

F4：ヒトPPAR δ の5' 非翻訳領域とN末端アミノ酸Met¹-Glu⁶に相当するセンスプライマー：5'-AGATCAGCCATGGAGCAGCCACAGGA-3' (配列番号7) を合成した。

R4：ヒトPPAR δ の3' 非翻訳領域に相当するアンチセンスプライマー：5'-ATTGGAGTCTGCAGGGAGGCCTGGGT-3' (配列番号8) を合成した。

ギブコBRL (GIBCO BRL) 社のスーパースクリプト・ヒューマンリバー cDNAライブラリー (Superscript Human Liver cDNA Library, 商品名, Cat. No.

10422-012)をcDNAライブラリーとしてF2とR2、F3とR3あるいはF4とR4をPCRプライマーとして用いて、サーマルシークエンサー (Perkin Elmer 社 GeneAmp PCR System 9600) を使用して、95℃で120秒×1→(95℃で60秒、60℃で90秒、72℃で120秒)×30→72℃で180
5 秒の条件でPCRを行なった、その結果、1450bpのヒトPPAR α 、1469bpのヒトPPAR γ 、1367bpのヒトPPAR δ を得、ノバゲン (Novagen) 社のT-ベクター (pT7Blue-T vector, Cat. No. 69836-1) に組み込み全塩基配列を確認した。

- 10 実施例3：エフェクター蛋白発現系：Gal4蛋白と核内受容体リガンド結合領域の融合蛋白 (Gal4キメラ受容体蛋白) をコードするcDNAを含む発現ベクターの構築

東洋インキ社のピカジーン・ベーシックベクター2 (Pica Gene Basic Vector 2 (登録商標), PGBV2, Cat. No. 309-04821) を基本ベクターとして用い、
15 構造遺伝子としてGal4キメラ受容体蛋白がSV40プロモーター支配下に発現するベクターを構築した。すなわち、PGBV2のルシフェラーゼ構造遺伝子を制限酵素NcoI、XbaIで切出し、以下のように作製したGal4キメラ受容体蛋白をコードするcDNAを挿入することで完成した。

- (1) Gal4転写因子のDNA結合領域をコードするDNAの発現ベクター
20 への組み込み

酵母の基本転写因子Gal4蛋白のDNA結合領域cDNAをpGBT9 (クロンテック社, Cat. No. K1605-A) を鋳型としてGal4の1番目から147番目までのアミノ酸をコードするDNA断片を実施例2と同反応条件でPCR増幅した。用いたプライマーは下記F5とR5である。

- 25 F5：Gal4のDNA結合領域N末端側1番目から8番目までのアミノ酸および5'側の一部にHindIII サイトと哺乳動物細胞内で有効に蛋白発現させる目的でコザック (kozak) 配列を付したセンスプライマー：5'-GCA

AGCTTCACCATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC-
3' (配列番号9) を合成した。

R5 : Gal4 のDNA結合領域C末端側141番目から147番目までのア
ミノ酸および5' 側の一部にNcoI サイトを付したアンチセンスプライ
マー : 5' -AGCCATGGCCGGCGATACAGTCAACTGTC
TTTG-3' (配列番号10) を合成し、実施例2と同反応条件でPCR増
幅した。その結果、約465bpの増幅DNA断片は全塩基配列を確認し、P
GBV2ベクター内のHindIII/NcoI 部位と組換した (以下、pGVgal
と略記する。)

- 10 (2) ヒトPPAR γ リガンド結合領域をコードするDNA断片の獲得および
Gal4-ヒトPPAR γ キメラ受容体蛋白発現ベクターの構築

実施例2に従ってヒト肝臓cDNAライブラリーから単離したヒトPPAR
 γ 全長cDNAを鋳型として、ヒトPPAR γ リガンド結合領域を含む
Ser¹⁷⁶ からTyr⁴⁷⁸ をコードするDNA断片を下記プライマーを合成し、

- 15 実施例1と同反応条件でPCR増幅した。

F6 : Ser¹⁷⁶ からMet¹⁸⁵、5' 側にNcoI サイト、SV40T抗原由
来の核移行シグナル (AlaProLysLysLysArgLysVal
Gly)、およびBamHI サイトを順に並べたセンスプライマー : 5' -GC
CATGGCTCCTAAGAAGAAGCGTAAGGTAGGATCCC
ATAATGCCATCAGGTTTGGGCGGAT-3' (配列番号1
1) を合成した。

R6 : Glu⁴⁷² からTyr⁴⁷⁸、SalIサイトに続いて発現蛋白質の検出用
にエピトープタグシーケンスとしてインフルエンザのヘマグルチニンエピ
トープ (TyrProTyrAspValProAspTyrAla)、翻訳
停止コドンおよびXbaI サイトを順に並べたアンチセンスプライマー : 5'
-CCTCTAGACTAGCTGGCATAGTCGGGACGTCGT
AGGGGTAGTCGACGTACAAGTCCTTG TAGATCTCC

－3′（配列番号12）を合成した。

前記した pGVgal の Gal4 DNA結合領域をコードするDNA下流の NcoI/ルシフェラーゼ構造遺伝子下流の XbaI 部位からルシフェラーゼ構造遺伝子を切出し、ヒトPPAR γ リガンド結合領域をコードするDNA断片とを入れ替え、目的とするエフェクター蛋白の発現ベクターを得た（以下、pGVgal/ γ LBDと略記する。）。

（3）ヒトPPAR α リガンド結合領域をコードするDNA断片の獲得および Gal4－ヒトPPAR α キメラ受容体蛋白発現ベクターの構築

ヒトPPAR α リガンド結合領域を含む下記プライマーを合成し、実施例2と同反応条件でPCR増幅し、PPAR α リガンド結合領域構造遺伝子を合成した。このようにして得られたPPAR α リガンド結合領域構造遺伝子を前記で合成した pGVgal/ γ LBDベクターの制限酵素サイトの BamHI、SalI 部位を両制限酵素の消化によりPPAR γ リガンド結合領域構造遺伝子のみを切出したものへ挿入し、Gal4－ヒトPPAR α キメラ受容体蛋白発現ベクターを構築した（以下、pGVgal/ α LBDと略記する。）。

F7：ヒトPPAR α アミノ酸の Ser¹⁶⁷ から Arg¹⁷⁵ に相当し、その5′側に BamHI サイトを有するセンスプライマー：5′－CACGGATCC CACAACGCGATTTCGTTTTGGACGA－3′（配列番号13）を合成した。

R7：ヒトPPAR α アミノ酸の Gln⁴⁶¹ から Tyr⁴⁶⁸ に相当し、その5′側に SalI サイトを有するアンチセンスプライマー：5′－ATGGGTCGACGTACATGTCCCTGTAGATCTCCTG－3′（配列番号14）を合成した。

（4）ヒトPPAR δ リガンド結合領域をコードするDNA断片の獲得および Gal4－ヒトPPAR δ キメラ受容体蛋白発現ベクターの構築

ヒトPPAR δ リガンド結合領域を含む下記プライマーを合成し、実施例2と同反応条件でPCR増幅し、PPAR δ リガンド結合領域構造遺伝子を合成

した。このようにして得られたPPAR δ リガンド結合領域構造遺伝子を前記で合成したpGVgal/ γ LBDベクターの制限酵素サイトのBamHI、SalI部位を両制限酵素の消化によりPPAR γ リガンド結合領域構造遺伝子のみを切出したものへ挿入し、Gal4-ヒトPPAR δ キメラ受容体蛋白発現ベクターを構築した（以下、pGVgal/ δ LBDと略記する。）。5

F8：ヒトPPAR δ アミノ酸のSer¹³⁹からArg¹⁴⁷に相当し、その5'側にBamHIサイトを有するセンスプライマー：5'-CACGGATCC CACAACGCTATCCGTTTTGGTCGG-3'（配列番号15）を合成した。

10 R8：ヒトPPAR δ アミノ酸のGln⁴³⁴からTyr⁴⁴¹に相当し、その5'側にSalIサイトを有するアンチセンスプライマー：5'-ATGGTCCG ACGTACATGTCCTTGTAGATCTCCTG-3'（配列番号16）を合成した。

15 実施例4：レポーター遺伝子：Gal4転写因子応答配列下にTKプロモーター、さらにMFas構造遺伝子を配したレポータープラスミドの構築

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（TK）プロモーター支配下の発現ベクターpTK β （クロンテック社、Cat. No. 6179-1）を用いた。pTK β の β ガラクトシダーゼ構造遺伝子上流および下流のNotIサイトを消化し、20 平滑化した。次に挿入するDNA断片であるMFas蛋白をコードするDNAをpBSMFasからHindIII、BamHIの両制限酵素で消化し、切出した後、平滑化した。両DNA断片をライゲートし、TKプロモーター下流にMFas構造遺伝子が順方向に連結したクローンを選択した。得られた約4400bpのプラスミドpTK-MFasはTKプロモーター支配下にMFas蛋白25 をコードするDNAを配している。次いでプラスミドpTK-MFasのTKプロモーター上流のSalIサイトを消化し、平滑化後、マルチクローニングサイトをリンカーDNA（配列番号17、EcoRI-SalI-KpnI-

E c o R V - S a c I - o t I) :

5' -GAATTCGTCGACGGTACCGATATCGAGCTCGCGGCCGC-3'

3' -CTTAAGCAGCTGCCATGGCTATAGCTCGAGCGCCGGCG-5'

として挿入し、pTK-MF a s -M L 1 (5' -E c o R I -S a l I -
5 K p n I -E c o R V -S a c I -N o t I -3') とした。

基本単位 (U A S) を 4 回繰り返し、両側末端に S a l I サイト / S a c I
サイトをもつ G a l 4 応答配列 : 5' -T (C G A C G G A G T A C T G T C
C T C C G) × 4 A G C T -3' (配列番号 18) を pTK-MF a s -M L
1 マルチクローニングサイト内の S a l I -S a c I 部位へ挿入すること
10 によってエンハンサー領域とした。その結果、4 × U A S に続いて TK プロモ
ーター、M F a s 構造遺伝子を配する p 4 × U A S -T K -M F a s (約 4600
b p) を構築した。

得られた発現ベクター p S V g a l / α L B D、p S V g a l / γ L B D または
p S V g a l / δ L B D のいずれかとレポータープラスミドおよび p S V 2 b s r (科
15 研製薬株式会社、Cat. No. KK-500) を、各々制限酵素 A a t II 処理による線
形化、N o t I 処理による線形化、未処理 (非線形の状態のまま) の操作後、
量比 1 : 1 : 0.1 にて、リポフェクトアミン (Lipofect AMINE, GIBCO 社、Cat.
No. 18324-012) を用いて、マウス線維芽細胞 L 9 2 9 に導入した。Exp. Cell Res.,
197, 229 (1991) に記載された方法 (プラスチサイジン S 選択) にて安定導入さ
20 れた細胞を選択した。

実施例 5 : リガンド応答クローンの選択

1 ~ 2 週間の選択後、観測されたコロニーを限界希釈法にてセルクローニン
グし、増殖させた。例えば、各サブクローン 2×10^4 個 / $100 \mu l$ の割合
25 で 10 % 牛胎児血清 (F C S) を含む最少イーグル培地 (Earle's MEM) に浮
遊させ、96 穴マイクロタイタープレートに分配し、5 % 炭酸ガス中で 37 °C
で 4 ~ 6 時間培養した。P P A R γ リガンドとして知られている C S - 0 4 5

およびBRL-49653 (Cell, 83, 863(1995)、Endocrinology, 137, 4189(1996) および J. Med. Chem., 39, 665(1996)参照)、PPAR α リガンドとして知られているカルバサイクリンおよびETYA (J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 51, 157(1994)、Cell Structure and Function, 18, 267(1993)、Gene & Development, 10, 974(1996)およびEur. J. Biochem., 233, 242(1996)参照)、PPAR δ リガンドとして知られているカルバサイクリン(Gene & Development, 10, 974(1996)参照) およびメルク社化合物 (PCT国際出願国際公開 9728149号の実施例7化合物参照) を用いてリガンド添加条件で有意に死滅する細胞を選択した。すなわち、これらの化合物の最終濃度10 μ Mの2倍濃度の試料100 μ lを同培養ウェル中に添加し、さらに40時間培養した。上清を捨てた後に、クリスタルバイオレット液 (0.75%クリスタルバイオレット-0.25% NaCl-1.75%ホルムアルデヒドの50%エタノール液) に、室温で20分間浸し、ホスフェートバッファーセーライン (PBS) によるプレート洗浄を2回繰返して生存細胞を染色した (Cell, 66, 233(1991)参照)。プレートは直接マイクロプレートリーダーで570nmの吸光度を測定した。

実施例6 : PPAR γ 、 α および δ リガンドのプラスミド安定導入L929細胞を用いた殺細胞アッセイ

実施例5で得られた最も応答能の高いクローンを上記の方法で培養し、この培養細胞を用いて、上記の化合物を上記の方法で細胞死を起こさせ、生残細胞を染色し、吸光度を測定した。細胞死は24時間後から有意に出現し、36~40時間ではプラトー域に到達して完結した。

CS-045およびBRL-49653でPPAR γ リガンド応答クローンを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第1図(A)に示し、同様にコントロール細胞(L929)を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第1図(B)に示す。カルバサイクリンおよびWy-14643でPPAR γ リガンド応答クローンを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変

化を第2図(A)に示し、同様にコントロール細胞(L929)を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第2図(B)に示す。

また、カルバサイクリン、ETYA、Wy-14643 およびCS-045でPPAR α リガンド応答クローンを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第3図(A)に示し、同様にコントロール細胞(L929)を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第3図(B)に示す。

さらに、カルバサイクリン、メルク社化合物、ETYA、およびCS-045でPPAR α リガンド応答クローンを40時間処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第4図(A)に示し、同様にコントロール細胞(L929)を化合物処理した時の生細胞数の用量依存的な変化を第4図(B)に示す。

なお、各図とも、溶媒のみを添加し、化合物を添加しない時の生細胞数の割合を100%として表示している。

第1図から明らかなように、エフェクター蛋白Ga14-ヒトPPAR γ キメラ受容体蛋白の発現ベクターを安定導入した細胞ではPPAR γ アゴニストとして知られているCS-045およびBRL-49653はL929細胞に対し、直接的な毒性を示さないが、応答細胞を有意に死滅させ、しかも用量依存的な細胞死を示した。しかも、同じPPAR γ アゴニストであってもPPAR γ 蛋白との結合親和性が高い、あるいは転写活性化能の大きな化合物(Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 431(1996)参照)ほど低濃度から著明な殺細胞作用を示した。

第2図から明らかなように、PPAR α アゴニストとして知られているカルバサイクリンやPPAR α 受容体アゴニストとして知られているWy-14643に対しては毒性を示さない各々10 μ M、100 μ M以下の濃度では細胞死を示さない。特に、カルバサイクリンがPPAR γ アゴニスト活性を示さない10 μ M以下の濃度(Genes & Development, 10, 974(1996)参照)では、このPPAR γ リガンド応答細胞では全く細胞死を示さない。

第3図から明らかなように、PPAR α アゴニストとして知られているカル

バサイクリン、ETYAおよびWy-14643 に対しては用量依存的な細胞死を示す。一方、PPAR γ アゴニストとして知られているCS-045に対しては毒性を示さない10 μ M以下の濃度では細胞死を示さない。しかも、同じPPAR α アゴニストであってもPPAR α 蛋白との結合親和性が高い、あるいは転写活性化能の大きな化合物ほど低濃度から著明な殺細胞作用を示した。

第4図から明らかなように、PPAR δ アゴニストとして知られているカルバサイクリンおよびメルク化合物に対しては用量依存的な細胞死を示す。一方、PPAR γ アゴニストとして知られているCS-045やPPAR α アゴニストとして知られているETYAに対しては毒性を示さない10 μ M以下の濃度では細胞死を示さない。しかも、同じPPAR δ アゴニストであってもPPAR δ 蛋白との結合親和性が高い、あるいは転写活性化能の大きな化合物ほど低濃度から著明な殺細胞作用を示した。

以上の第1図、第2図、第3図および第4図の結果から、機能的なMFasペプチドの過発現によって細胞死がメディエートされること、PPAR γ リガンド応答細胞はPPAR γ リガンドの作用強度に、PPAR α リガンド応答細胞はPPAR α リガンドの作用強度に、またPPAR δ リガンド応答細胞はPPAR δ リガンドの作用強度に、よく相関して細胞死を起こすことが判明した。さらに、PPARのみならず他の核内受容体を用いた場合も、またヒトのみならず別の動物種由来のPPARを用いた場合でも細胞死は生じた。本発明のレポーターアッセイを用いれば、プラスミドを安定導入したりリガンド高応答クローンの獲得によって、核内受容体リガンドを容易にかつ、特異的に評価できる。しかもレポーターアッセイで評価しうる被験化合物の作用量は本発明のシステムにおける殺細胞作用を示す濃度域と極めて一致しており、各リガンドの作用強度も併せて評価することができる優れた方法である。

配列リスト

配列番号：1

配列の長さ：35

配列の型：核酸

5 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

CCAAGCTTGG CGACCAGCAA TACAAACTGCAG GAAAC

10 配列番号：2

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

15 配列

TCAGGATCCA GACATTGTCC TTCATTTTCA TT

配列番号：3

配列の長さ：26

20 配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AACCAGCACC ATCTGGTCGC GATGGT

25

配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

5 AGGTGTGGCT GATCTGAAGG AACTCA

配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

10 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGAAATGACC ATGGTTGACA CAGAGA

15 配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

20 配列

AAATGTTGGC AGTGGCTCAG GACTCT

配列番号：7

配列の長さ：26

25 配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

AGATCAGCCA TGGAGCAGCC ACAGGA

配列番号 : 8

5 配列の長さ : 2 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

10 ATTGGAGTCT GCAGGGAGGC CTGGGT

配列番号 : 9

配列の長さ : 3 7

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列

GCAAGCTTCA CCATGAAGCT ACTGTCTTCT ATCGAAC

20 配列番号 : 1 0

配列の長さ : 3 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

25 配列

AGCCATGGCC GGCGATACAG TCAACTGTCT TTG

配列番号：1 1

配列の長さ：6 2

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

5 トポロジー：直鎖状

配列

GCCATGGCTC CTAAGAAGAA GCGTAAGGTA GGATCCCATA ATGCCATCAG GTTTGGGCGG 60
AT 62

10 配列番号：1 2

配列の長さ：6 9

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

15 配列

CCTCTAGACT AGCTGGCATA GTCGGGCACG TCGTAGGGGT AGTCGACGTA CAAGTCCTTG 60
TAGATCTCC 69

配列番号：1 3

20 配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

25 CACGGATCCC ACAACGCGAT TCGTTTTGGA CGA

配列番号：1 4

配列の長さ：3 1

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

5 トポロジー：直鎖状

配列

ATGGTCGACG TACATGTCCTG TAGATCTCCT G

配列番号：1 5

10 配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

15 CACGGATCCC ACAACGCTAT CCGTTTTGGT CGG

配列番号：1 6

配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

20 鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

ATGGTCGACG TACATGTCCT TGTAGATCTC CTG

25 配列番号：1 7

配列の長さ：3 8

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

GAATTCGTCG ACGGTACCGA TATCGAGCTC GCGGCCGC

5 CTTAAGCAGC TGCCATGGCT ATAGCTCGAG CGCCGGCG

配列番号：18

配列の長さ：85

配列の型：核酸

10 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TCGACGGAGT ACTGTCCTCC GCGACGGAGT ACTGTCCTCC GCGACGGAGT ACTGTCCTCC 60

GCGACGGAGT ACTGTCCTCC GAGCT 85

15

請求の範囲

1. G a l 4 蛋白の応答配列の下流に、プロモーター、さらにF a s 抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列をコードするDNAを含むプラスミドDNA。
- 5 2. F a s 抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列が、マウスF a s 抗原の136番目から305番目までのアミノ酸配列であるか、またはヒトF a s 抗原の145番目から319番目までのアミノ酸配列である請求の範囲第1項記載のプラスミドDNA。
- 10 3. F a s 抗原の膜貫通領域と機能発現領域を含むアミノ酸配列のN末端に、F a s 抗原のシグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列を結合させた請求の範囲第1項または第2項記載のプラスミドDNA。
4. F a s 抗原のシグナルペプチド領域を含むアミノ酸配列が、マウスF a s 抗原の-21番目から14番目までのアミノ酸配列であるか、またはヒトF a s 抗原の-16番目から23番目までのアミノ酸配列である請求の範囲第3項記載のプラスミドDNA。
- 15 5. 請求の範囲第1項記載のプラスミドDNAとエフェクター蛋白をコードするDNAの両DNAで形質転換された形質転換体。
6. エフェクター蛋白がG a l 4 蛋白のDNA結合領域を含むアミノ酸配列のC末端に、細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列を結合させた融合蛋白である請求の範囲第5項記載の形質転換体。
- 20 7. 細胞核内受容体がステロイド受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。
8. 細胞核内受容体がP P A R α 受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。
- 25 9. 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトP P A R α 受容体の167番目から468番目までのアミノ酸配列、またはマウスP P A R α 受容体の167番目から468番目までである請求の範囲第8項記載の

形質転換体。

10. 細胞核内受容体がPPAR δ 受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。

11. 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトPPAR δ 受容体の139番目から441番目までのアミノ酸配列、またはマウスPPAR δ 受容体の138番目から440番目までである請求の範囲第10項記載の形質転換体。

12. 細胞核内受容体がPPAR γ 受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。

13. 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列がヒトPPAR γ 1受容体の176番目から478番目までのアミノ酸配列、マウスPPAR γ 1受容体の174番目から475番目までのアミノ酸配列、ヒトPPAR γ 2受容体の204番目から506番目までのアミノ酸配列、またはマウスPPAR γ 2受容体の204番目から505番目までである請求の範囲第12項記載の形質転換体。

14. 細胞核内受容体がレチノイドX受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。

15. 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列が、ヒトレチノイドX受容体 α の225番目から462番目までのアミノ酸配列、ヒトレチノイドX受容体 β の297番目から526番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイドX受容体 α の230番目から467番目までのアミノ酸配列、マウスレチノイドX受容体 β の171番目から410番目までのアミノ酸配列、またはマウスレチノイドX受容体 γ の229番目から463番目までのアミノ酸配列である請求の範囲第14項記載の形質転換体。

16. 細胞核内受容体がレチノイン酸受容体である請求の範囲第6項記載の形質転換体。

17. 細胞核内受容体のリガンド結合領域を含むアミノ酸配列が、ヒトレチ

ノイン酸受容体 α の198番目から462番目までのアミノ酸配列、ヒトレチ
ノイン酸受容体 β の191番目から448番目までのアミノ酸配列、ヒトレチ
ノイン酸受容体 γ の200番目から454番目までのアミノ酸配列、マウスレ
チノイン酸受容体 α の198番目から462番目までのアミノ酸配列、マウス
5 レチノイン酸受容体 β の190番目から448番目までのアミノ酸配列、また
はマウスレチノイン酸受容体 γ の200番目から458番目までのアミノ酸配
列である請求の範囲第16項記載の形質転換体。

18. 細胞核内受容体がビタミンD₃受容体である請求の範囲第6項記載の
形質転換体。

10 19. 細胞核内受容体が甲状腺ホルモン受容体である請求の範囲第6項記載
の形質転換体。

20. 請求の範囲第1項から第4項のいずれかに記載のプラスミドDNAと
エフェクター蛋白をコードするDNAを有効成分として含有するガンまたは
自己免疫疾患の治療剤。

15 21. 請求の範囲第5項から第19項のいずれかに記載された形質転換体を
形質転換するためのDNAを有効成分として含有するガンまたは自己免疫疾患
の治療剤。

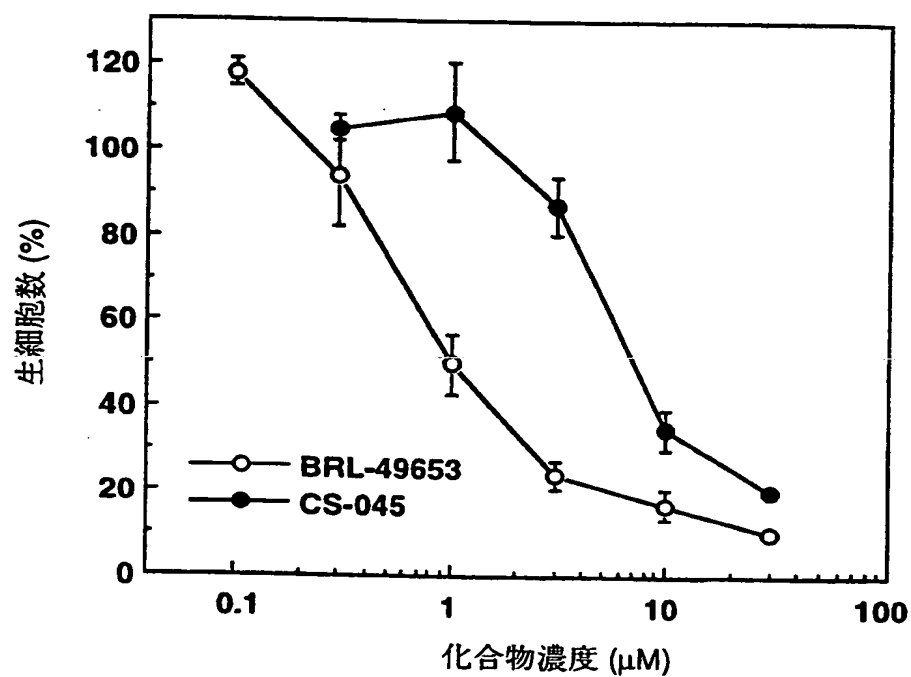
22. 請求の範囲第5項から第19項のいずれかに記載された形質転換体を
用いることを特徴とする細胞核内受容体に対するアゴニストまたはアンタゴニ
20 ストのスクリーニング方法。

23. 請求の範囲第5項から第19項のいずれかに記載された形質転換体が、
マウス繊維芽細胞L929またはヒトガン細胞HeLaであることを特徴と
する、PPAR α 受容体、PPAR γ 受容体またはPPAR δ 受容体に対する
アゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法。

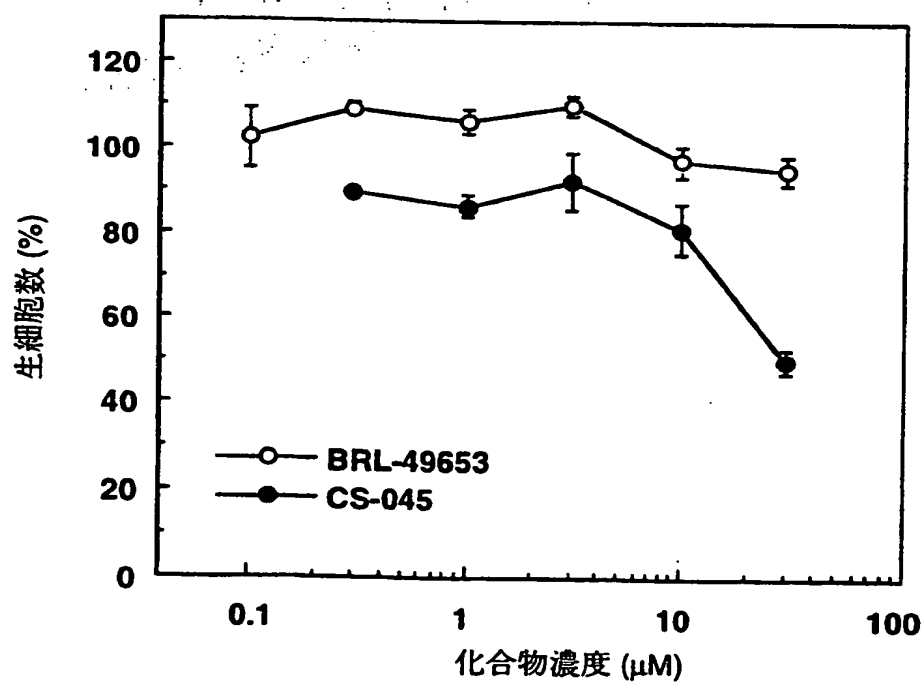
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 1 図

(A)



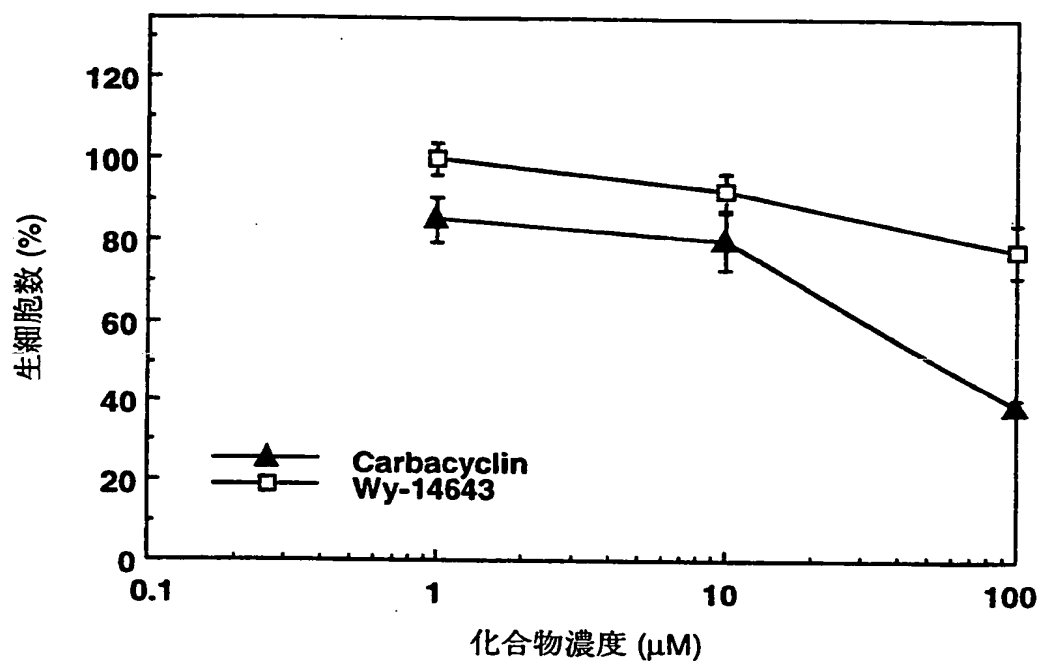
(B)



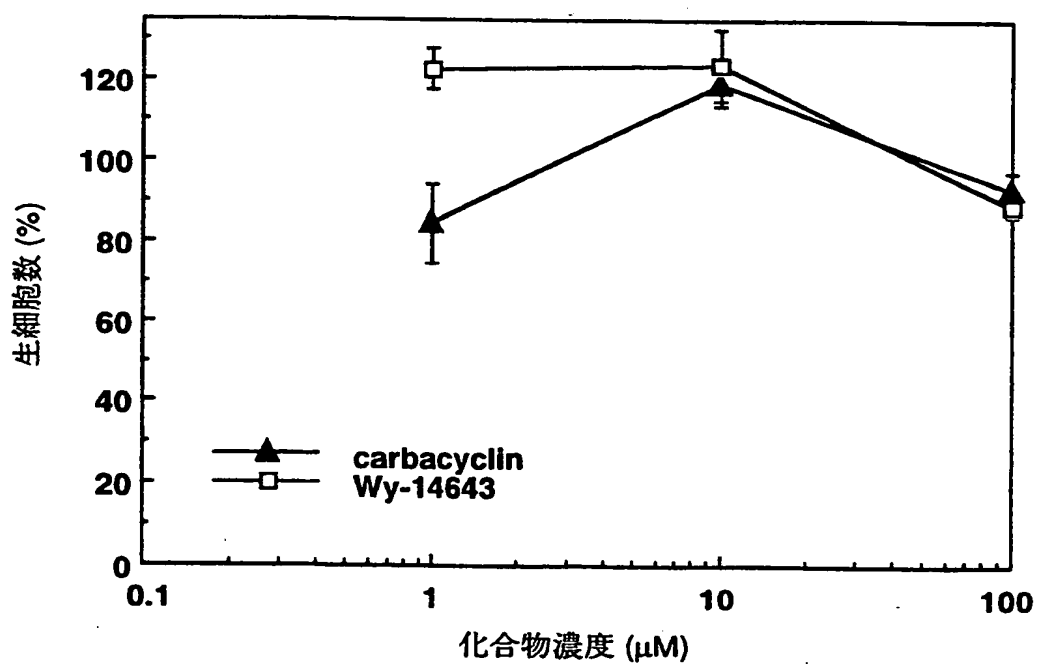
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 図

(A)



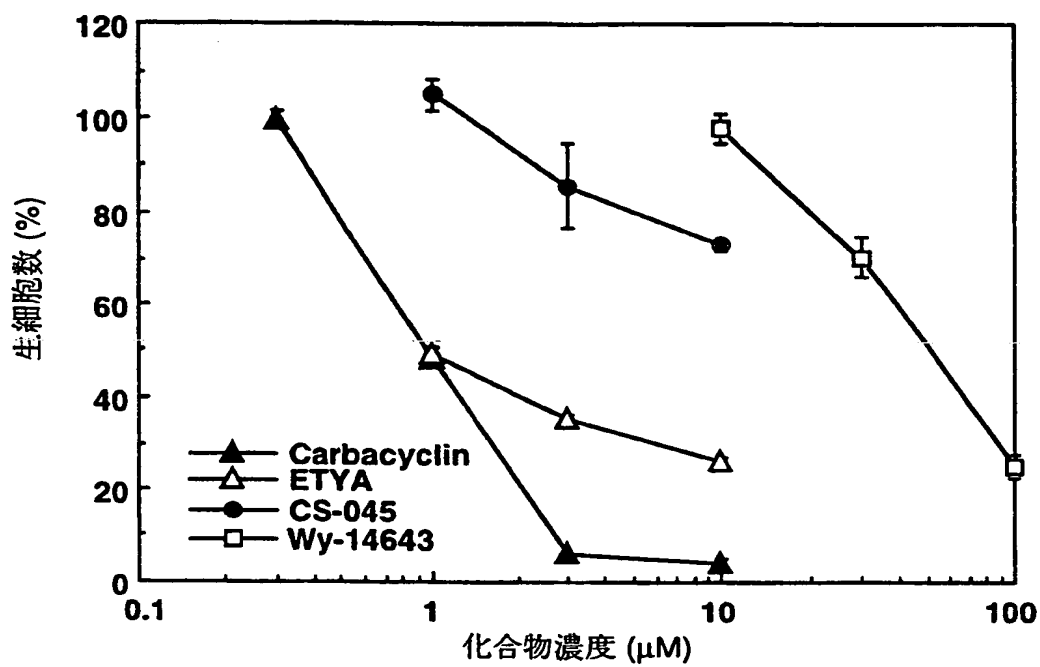
(B)



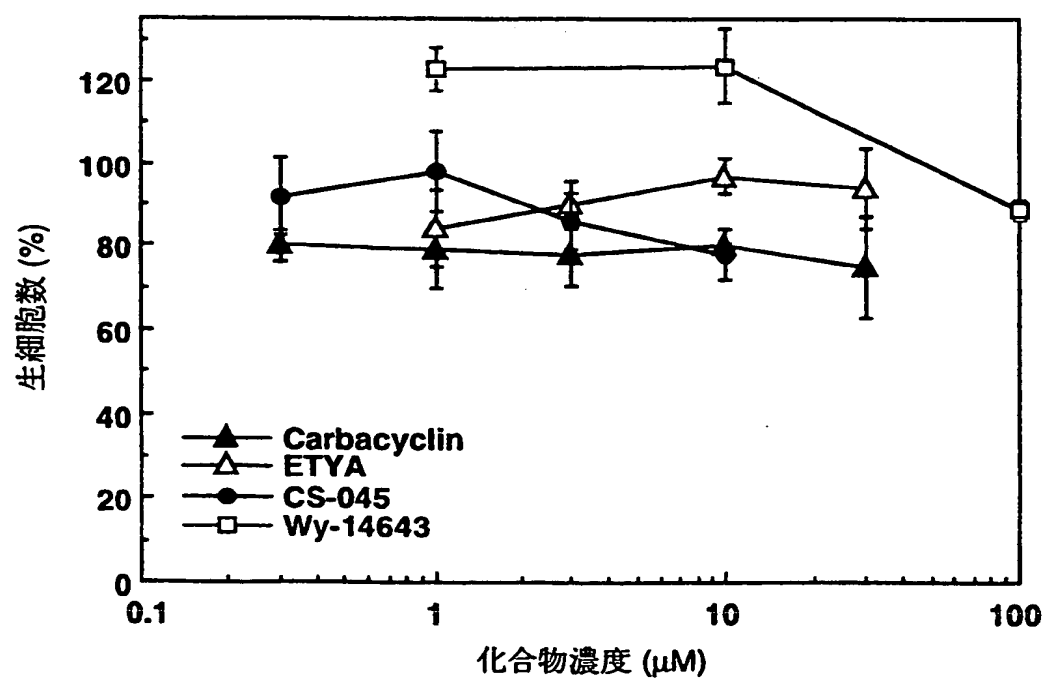
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 3 図

(A)



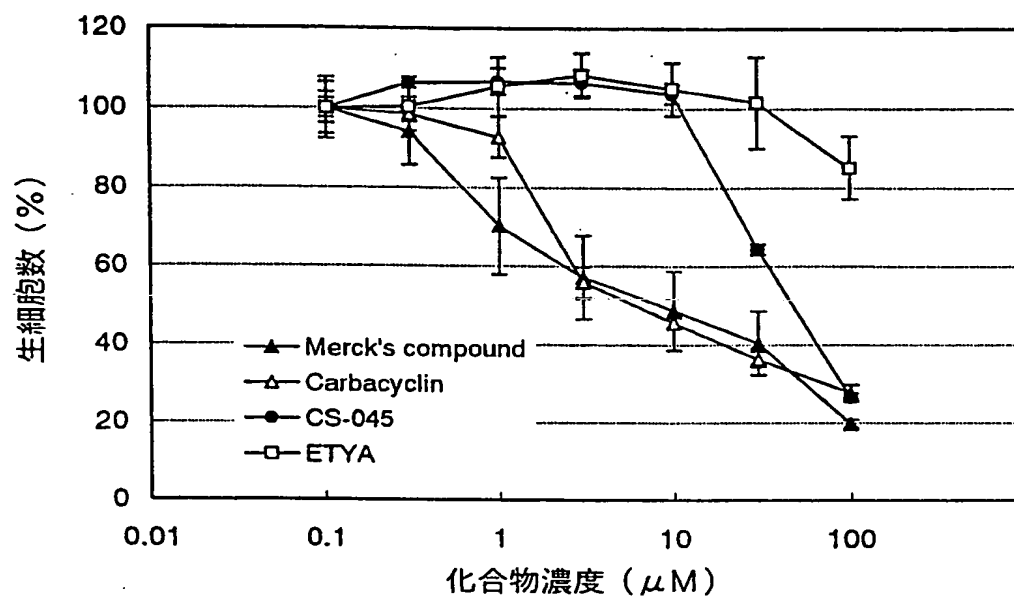
(B)



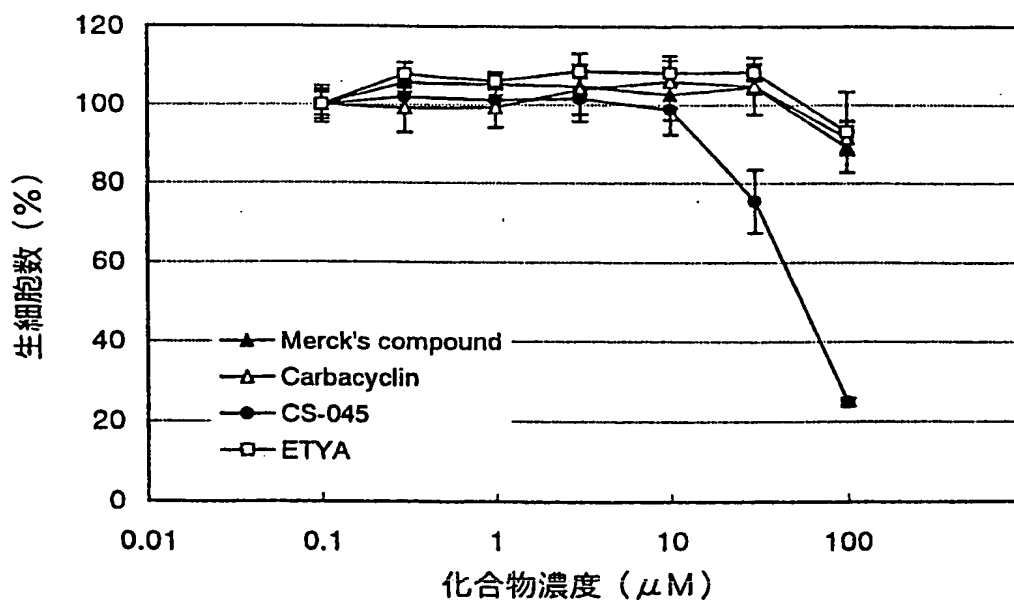
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 4 図

(A)



(B)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/566, C12N5/10, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/566, C12N5/10, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Medline, Biosis Previews

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-504111, A (The Salk Institute for Biological Studies), April 22, 1997 (22. 04. 97) & EP, 737314, A & AU, 9514366, A & WO, 9518380, A	1-23
A	WO, 9640128, A (Salk Inst Biological Studies), December 19, 1996 (19. 12. 96) (Family: none)	1-23
A	JP, 7-316200, A (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), December 5, 1995 (05. 12. 95) (Family: none)	1-23
A	Cancer Letters, Vol. 116, (1997), Kawaguchi Y. et al., "Expression of Fas-estrogen receptor fusion protein induces cell death in pancreatic cancer cell lines" p.53-59	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
July 16, 1998 (16. 07. 98)

Date of mailing of the international search report
July 28, 1998 (28. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/02785

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/566, C12N5/10,
A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/566, C12N5/10,
A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Medline, Biosis Previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-504111, A (サーク インスティテュート フォア バイオロジカル スタディーズ) 22. 4月. 1997 (22. 04. 97) & EP, 737314, A&AU, 9514366, A&WO, 9518380, A	1-23
A	WO, 9640128, A (Salk Inst Biological Studies) (19, 12, 96) (ファミリーなし)	1-23
A	JP, 7-316200, A (小野薬品工業株式会社) 05. 12月. 1995 (05. 12. 95) (ファミリーなし)	1-23
A	Cancer Letters, 第116巻, (1997), Kawaguchi Y. et al 「Expression of Fas-estrogen receptor fusion protein induces cell death in pancreatic cancer cell lines」 p. 53-59	1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 07. 98

国際調査報告の発送日

28.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平 田 和 男

4B

7823

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)